



СТАНОВИЩЕ

върху дисертационен труд на тема:

ЕНТЕРОКОКИТЕ - НА ГРАНИЦАТА НА ПОЛЕЗНОТО И ВРЕДНОТО

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ по научната специалност

4.3. Биологични науки – докторантска програма- Микробиология

Автор на дисертационния труд: **Мария Илиева Пандова**

Научен ръководител: **проф. д-р Петя Койчева Христова**

Рецензент: **проф. Д-р Светла Трифонова Данова, дн**

1. ОТНОСНО ПРОЦЕДУРАТА:

Научното жури е отдадено със заповед № РД-38-360/07.07.25 г. на Ректора на СУ „Кл. Охридски“ на основание решение на Факултетен съвет на Биологически факултет от 24.06.2025 г. (Протокол № 9).

Като член на това жури декларирам, б че нямам общи публикации, проекти или конфликт на интереси от друг характер по смисъла на ал. 1 т. 3 и 5 от ЗРАСРБ с оценявания кандидат за придобиване на ОНС „Доктор“.

1. ОЦЕНКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

2.1. Актуалност на разработвания научен проблем и оформление на дисертационния труд

Представеният ми за рецензия дисертационен труд представя едно модерно молекулярно-генетично изследване на ентероки от различни екологични ниши. Оригинален елемент е включването на изолати от чревния тракт на *Cornu aspersum* (градински охлюв), като напълно непроучен хабитат, далече от клинично значимите такива. Още заглавието поставя на дневен план двойствената роля на ентерококите – добри бактерии като коменсали и като патогени, със сериозен импакт върху клиничните заболявания. Не случайно 2017 г. Световната здравна организация поставя род *Enterococcus* на първо място в ESKAPE групата, за която е необходимо спешно разработването на нови антимикробни вещества. Това обяснява защо акцентът в работата се поставя върху генетичните основи на тяхната вирулентността и роля като патогени. Ентерококите поради високата си антибиотична резистентност, от мулти до Пан резистентни са определени като болестотворни агенти с „приоритетен статус“ (СЗО, 2017). Поради тази причина антибиотичната резистентност при ентерококите, представлява голям интерес към днешна дата и това е отчетено в работата. Появата на т.нар. „superbugs“, се оценява като далеч по-голям риск за човешкото здраве от пандемията с *Covid-19*, заплашващ да върне съвременната медицина „обратно в тъмните векове“ – на предантибиотичната ера.

Научните резултати могат да допълнят картината на възможни природни резервоари на гени за антибиотична резистентност. Всичко това ми дава основание да оценя работата като актуална и значима като съвременна научна и научно-приложна разработка.

Представеният за рецензия труд е написан в стегнат научен стил, граматически издържано и добре структуриран на 144 стандартни страници, като заедно с приложението и списъка на използваната литература достига 202 стр. Спазени са условията и структурата на дисертационен труд за ОНС „Доктор“, както следва: *Въведение* - 2 стр., *Литературен обзор* - 51 стр., *Материали и методи* - 14 стр., *Резултати и обсъждане* - 63 стр.; *Изводи* - 1 стр. *Приноси* - 1 стр. и *Литературни източници* - 49 стр., Приложение - 5 стр. Безспорно полезни са включените 2 страници с използвани съкращения. Работата е богато илюстрирана с 29 цветни фигури и 14 таблици. Оценявам високо качеството на фигурите, особено илюстриращи пълногеномните секвенции и CRISPR системата, гени за вирулентност вкл. в литературния обзор (напр. Фиг. 7 и 8). В 21 век докторантката иновативно използва потенциала на нови приложения на графични програми и софтуери, дори и при фигурите за статистическа достоверност и сравнителен анализ между групите (напр. фиг. 16).

2.1. Литературната осведоменост и теоретична подготвеност на кандидата

Литературният обзор е много обемен, но фокусиран върху темата на дисертационния труд. В пълно съответствие със заглавието са разгледани: Общите таксономични белези на бактериите от род *Enterococcus* и в логическа последователност първо е обобщена актуална информация за представителите като причинители на вътреболнични заболявания, с факторите на вирулентност и придобита антибиотична резистентност, достигайки до генетичните основи на патогенезата (Условия за хоризонтален трансфер на гени CRISPR системата). Подобаващо място в обзора е отделено на положителните характеристики на ентерококите - от приложението им в храни за хора и животни, през продукти с положителен ефект върху човешкия организъм и регулация на използването на ентерококите на пазара, през призмата на тяхната безопасност. Отделено е повече от нужното внимание на данните за продукция на бактериоцини и тяхната класификация, но тази информация е в основата на една от експерименталните задачи и целта.

Докторантката борави правилно с различната научна терминология и понятия, особено в биоинформатичната област. Това придава актуален акцент и иновативност на работата, а именно в търсенето на генетичните основи на тези бактерии, прилагайки новите омикс технологии. Не мога да не отбележа огромния брой за такъв вид работа цитирани литературни източници - 500. Това е безспорно доказателство за упоритост, задълбоченост и отлична теоретична и методична подготвеност на докторантката. Доказва го и обобщението на данните от литература, с което завършва литературния обзор и води към логически обоснована цел и задачи. Направеният литературен преглед разкрива подробно двостепенната роля на ентерококите и със заключителното обобщение е обоснована необходимостта от тяхното допълнително проучване в нови неизследвани хабитати.

2.2. Цел, задачи и анализ на методичните подходи в дисертационния труд

Цел на докторантския труд е „Детайлна характеристика на видове от род *Enterococcus* с оглед установяване на биологичните им свойства, разкриващи тяхната двойствена природа – като полезни или вредни микробни агенти“. За постигането и са формулирани 3 задачи, две от които с по 3 подзадачи.

Формирана е група от 72 щама - колекционни и новоизолирани, от кърма, от интестиналния тракт на охлюви и различни храни, готови за консумация. Ясно са посочени референтните 7 щама, но такава важна информация като брой изплати/брой проби от включените за изследване хабитати е пропусната. А това е важно при дискусията на находката за потенциални патогенни напр. от проба/и кисело мляко!? По-разнообразни, като методични подходи и като рамка е оценката на характеристики, асоциирани с потенциал за причиняване на заболявания.

Мария Пандова е използвала правилно подбрани и методично поставени класически микробиологични подходи, в началната характеристика на патогенния потенциал на групата от 72 изолата. За решаването и на 3^{те} задачи е включен широк набор от модерни молекулярно-генетични методи с доказана дискриминативна възможност, възпроизводимост и релевантност на получаваните данни. Високо оценявам подходите за обработка на резултатите от генетичните изследвания и биоинформатични анализи за постигане целта на дисертацията, които за разлика от други подобни изследвания е правила сама. Това ми дава основание да считам, че докторантката е изградила много солидни умения за методичен подбор както на класически микробиологични така и на модерни генетични подходи, които успешно адаптира за изпълнение на поставените експериментални задачи. В описанието им би било добре да се посочат за секвенционните WGS анализи (къде са осъществени, китове, условия като нова и малко позната методика) и ключовата за всеки PCR анализ информация за използваните праймери. Мария Пандова успешно прилага нелекото „полиране“ на long read получените секвенции и *in silico* анализите, които са много сериозно предизвикателство и безспорно иновативно изградено знание. Важен елемент също е включването на положителните контроли, които са доказателство за успешен PCR анализ, позволяващ обективна оценка на търсения генетичен елемент.

2.4. Оценка на постигнатите резултати, изводите и приноси на дисертационния труд

Работата подчертано има интердисциплинарен характер и изисква не само теоретична, но и сериозна експериментална подготовка. Получени са важни научни резултати, изложени на 63 стр. но тяхното представяне и най-вече скромната дискусия сякаш скрива логическата им надстройка, която е добре замислена. Това не омаловажава тяхната значимост и иновативност. За доказване на положителните характеристики на ентерококите усилията на докторантката са насочени към антимикробна продукция, динамика и устойчивост и търсене на генетичните основи, в генома на пълногеномно секвенирани представители на ентерококите. Докторантката умело съчетава индуктивен и дедуктивен подход в решаване на нелеките експериментални задачи по оценка на видовото разнообразие и потенциал (патогенен и положителен) на ентерококите в слабо проучени и неизследвани до момента микробиом на кърма, на охлюви и някои храни. Основополагаща

е информацията за видовото разнообразие на ентерококите в избраните от докторантката хабитати. За първи път е оценено представянето на видове от род *Enterococcus* и техния патогенен потенциал в микробиома на градински охлюви. Добре илюстрирано е биоразнообразието, но за сравнителен анализ на представителството им е важно да се добави броят проби за всяка екологична ниша, съотнесен към идентифицираните видове.

В тази връзка бих попитала докторантката: *Как изискванията на съвременната полифазна таксономия, могат да бъдат използвани за ефективна и успешна идентификация на ентерококи в нови/непроучени хабитати? И защо е насочила значителна част от изследванията към микробиома на градински охлюви?*

Високо оценявам сравнителния анализ на получените данни от пълногеномното секвениране на 6 щамове, използвайки най-новия методичен подход – дълги прочити и направената сглобка на генома с т.нар. „полиране на секвенциите“. Асемблираните и анотирани секвенции на щамовете *E. faecalis* са депозирани в NCBI Genome с одобрени номера за достъп, както следва: CP173761-CP173764 (*E. faecalis* CM4); CP173669-CP173671 (*E. faecalis* BM5); CP173666-CP173668 (*E. faecalis* BM12); CP173758-CP173760 (*E. faecalis* 236 BM15), което допринася за използването на тази много важна научна информация. В допълнение докторантката умело интегрира биоинформатиката и CRISPR технологията, подход, който доказано революционизира разработването на антибиотици, диагностиката и изследванията на комплексна микробиота. Това е един от обещаващите подходи да се справят учените с глобални предизвикателства като антибиотична резистентност и намиране на устойчиви решения в здравеопазването и агро бизнеса.

Нова и важна информация е получена при *in silico* идентифицирането на псевдогени и PCR анализа на гени за вирулентност. Последните са много добре обобщени в таблица наподобяваща хитмап диаграма, която доказва обема и задълбочеността на изследването. Работата би спечелила от по-богата дискусия за представителството по отношение на хабитатите, в потвърждението на тезата за свързване факторите на вирулентност с антропогенен или друг произход и за да води директно към извод 1.

Получени са безспорно нови и важни научни резултати, които са обобщени в добре формулирани 9 извода. Оценявам високо работата на докторантката и безспорните приноси на разработката. Те са 3 научно-фундаментални, така и един приложен. Действително обемен научен труд със сериозни и задълбочени научни резултати в една оригинално замислена рамка и нови данни получени за клинично значимата група на ентерококите.

Това ми дава право да обобщя, че като цел, обем и резултати и приноси дисертацията напълно изпълнява и надвишава изискванията за получаване на ОНС „Доктор“. Темата и целта на дисертацията са оригинални и иновативни в частта на слабо-проучени хабитати, за неклинични ентерококи. Методите са правилно подбрани, методично адаптирани към изследването на група от 72 щамове. Материалът е дисертабилен и лично дело на докторантката. Доказват го и двете публикации, в реферирани международни издания, в които Мария Пандова е първи автор.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензираният дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно

значение. Той отговаря на всички условия на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на СУ-Биологически факултет.

Всичко това ми дава основание за цялостна висока оценка на дисертационния труд, въз основа на която предлагам на уважаваното научно жури да присъди на **Мария Илиева Пандова** образователната и научна степен „**ДОКТОР**” по научната специалност **4.3. Биологични науки; Докторантска програма- Микробиология**

Дата 14.09.2025 г.

/проф. С. Данова, дб